

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590755

研究課題名（和文） 肝細胞癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of immunotherapy to prevent recurrence of hepatocellular carcinoma

研究代表者

水腰 英四郎（MIZUKOSHI EISHIRO）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：90345611

研究成果の概要：本研究では肝癌患者における抗腫瘍免疫を効率的かつ強力に誘導できる手法を確立し、肝細胞癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発を行った。その結果、以下に記載する成果が得られた。1) 肝癌患者における抗腫瘍免疫反応を増強させる治療方法を同定した。2) 肝癌動物モデルにおける肝癌特異抗原を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導方法を確立した。3) 肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法を開発した。4) 肝癌患者における肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝細胞癌，免疫治療，細胞障害性 T 細胞，腫瘍抗原ペプチド，HLA-A24，樹状細胞，エピトープ

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における肝細胞癌(肝癌)による死亡者数は年間3万人を超え、今後さらに増加傾向にある。現在行われている肝癌の治療では、治療の根治性の低さによる局所再発と肝癌の特徴である異時性・多中心性発癌による他

部位再発のため、癌を十分に制御することは不可能であり、肝癌による死亡者数の減少には治療後再発の予防効果を兼ね備えた新たな治療方法の開発が急務である。一方、癌に対する新しい治療として、近年癌特異的抗原を認識し癌細胞を攻撃するリンパ球や宿主

の免疫機能を調節する樹状細胞を用いた癌特異的免疫治療が行われ、一部の症例では癌の消失や進行癌の進展阻止が得られることが報告されている。こうした抗原特異的な癌免疫療法は癌再発に対しても抑制効果が期待されることから、治療後再発を繰り返す肝癌の治療方法としては理想的である。しかしながら肝癌ではいまだこうした癌特異的免疫療法は確立されておらず、本治療法の確立が遅れている最大の原因は肝癌特異的な癌抗原の同定が進んでいないことにある。

我々はこれまでに肝癌における免疫療法を確立する第一歩として、肝癌に特異的に発現しており、かつ免疫治療の標的となりうる抗原の同定を行ってきた。これまでに肝癌に特異的な抗原とその細胞障害性 T 細胞(CTL) エピトープを同定しており、さらにこれらを用いて肝癌患者では肝癌に対する抗腫瘍免疫は弱いながらも存在すること、抗原エピトープのアミノ酸配列を含む合成ペプチドで患者リンパ球を刺激することによってこうした免疫反応を体外において増強できることを明らかにした。こうした背景を踏まえ、本研究では肝癌患者における抗腫瘍免疫をより効率的かつ強力に誘導できる手法を確立し、肝細胞癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発を行いたいと考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝癌患者における抗腫瘍免疫をより効率的かつ強力に誘導できる手法を確立し、肝細胞癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発を行うために、以下に示す如く 4 段階の目的を設定した。

1)肝癌患者における肝癌治療前後の抗腫瘍免疫反応の解析： 現在肝癌の標準的治療と

して行われている外科的切除・ラジオ波凝固療法・肝動脈塞栓療法・化学療法において治療前後における抗腫瘍免疫反応の変化を検討し、最も抗腫瘍免疫を増強させることのできる治療方法を同定する。抗腫瘍免疫の増強が観察された患者においては、治療前後における末梢血リンパ球の発現遺伝子解析、治療局所における免疫組織学的検討と発現遺伝子解析、血中サイトカインの測定により、抗腫瘍免疫に関与する因子の検討を行う。また、抗腫瘍効果の増強と治療効果との関連を検討し、抗腫瘍免疫を増強することが肝癌の局所治療効果や治療後再発の抑制に寄与するかどうかを検証する。

2)肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫反応の解析： 肝癌動物モデルを用いて肝癌の局所療法を行い、肝癌治療後の 1)における末梢血での検討に加え、ヒトの生体内では検証不可能な治療局所肝組織を含めた全肝の摘出を行い、癌治療部位と周囲肝組織へ浸潤している免疫担当細胞を同定する。さらに癌治療局所肝組織と非治療部肝組織の発現遺伝子解析を行う。これらの検討によって肝癌治療後の抗腫瘍免疫の誘導機序を肝癌動物モデルにおいて明らかにする。

3)肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発： 2)での検討において抗腫瘍免疫が誘導されたものには、これまでに我々が確立した樹状細胞療法や肝癌特異的な抗原由来人工ペプチドによる免疫療法を行い、肝癌治療において誘導された抗腫瘍免疫をさらに増強・維持させることのできる手法を開発する。

4)肝癌患者における肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発： 3)での検討において抗腫瘍免疫の増強・維持に有用と考えられる手法を 1 種類選定し、肝癌治療後の患者に行い、その安全性

を評価する。加えて抗腫瘍免疫に関する免疫モニタリングを行い、同治療の抗腫瘍効果の増強・維持力を評価し、臨床応用への可能性を判定する。

### 3. 研究の方法

4 段階に分けて設定した目的ごとの方法を示す。

#### 1) 肝癌患者における肝癌治療前後の抗腫瘍免疫反応の解析

現在肝癌の標準的治療として行われている外科的切除・ラジオ波凝固療法・肝動脈塞栓療法・化学療法において治療前後における抗腫瘍免疫反応の変化を肝癌患者において検討し、もっとも抗腫瘍免疫を増強させることのできる治療方法を同定する。抗腫瘍免疫反応の検討は、凍結保存してある血清と末梢血リンパ球を用いて行った。抗腫瘍免疫反応の評価は、(a) ELISA 法による血清中のサイトカインの測定、(b) 腫瘍抗原やペプチドを用いた ELISPOT アッセイ、(c) テトラマー染色とフローサイトメーターによる 4 カラー解析を用いた腫瘍抗原エピトープ特異的なリンパ球の検出とその表面マーカーの測定によって行った。

#### 2) 肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫反応の解析

肝癌動物モデルを用いて肝癌の局所療法（ラジオ波凝固療法）を行い、肝癌治療後の 1) における末梢血での検討に加え、ヒトの生体内では検証不可能な治療局所肝組織を含めた全肝の摘出を行い、癌治療部位と周囲肝組織へ浸潤している免疫担当細胞を同定した。

#### 3) 肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発

本検討では 2) での治療につづいて、サイトカ

イン、抗原ペプチド、樹状細胞を用いた免疫療法を追加することによって、標準的肝癌治療において誘導された抗腫瘍免疫を増強させることのできる方法を検討した。本検討では移植された癌をラジオ波焼灼療法により一旦消滅させ、対側皮下に再度癌を移植し、その腫瘍径を経時的に観察することによって、癌の再発制御を目的とする免疫療法の抗腫瘍効果を判定した。

#### 4) 肝癌患者における肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発

1) での検討により、治療後に肝癌に特異的な抗腫瘍免疫を最も誘導できる標準的治療法を選択した。こうした実際の治療によって誘導される肝癌に対する免疫反応を 1) と同様の手法を用いて解析し、3) での検討においてより抗腫瘍効果の増強・維持に有用と考えられ、ヒトでの応用が可能である手法を選定した。

### 4. 研究成果

本研究では肝癌患者における抗腫瘍免疫を効率的かつ強力に誘導できる手法を確立し、肝癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発を行った。本研究では以下に示す成果が得られた。

1) 肝癌患者における抗腫瘍免疫反応を増強させる治療方法の同定：現在肝癌の標準的治療として行われている外科的切除・ラジオ波凝固療法・肝動脈塞栓療法・化学療法において治療前後における抗腫瘍免疫反応の変化を検討し、抗腫瘍免疫を増強させるのに適した治療方法がラジオ波凝固療法と肝動脈塞栓療法であることを同定した。

2) 動物モデルにおける肝癌特異抗原を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導方法の確立：肝癌動物モデルを用いて肝癌の局所療法（ラジ

オ波凝固療法)を行い、肝癌治療後の免疫反応を解析できるモデルを確立した。さらにこのモデルの解析により、治療後の抗腫瘍免疫を担当する細胞として、CD4/CD8 陽性 T 細胞、マクロファージ、樹状細胞が重要であることを確認した。さらに HLA-A24 をもつマウス動物モデルを用いて、これまでに我々が確立した肝癌特異的な抗原由来人工ペプチドによる免疫療法を行い、抗腫瘍免疫を誘導できる手法の開発を試み、同手法の安全性と有効性を確認した。

3)肝癌動物モデルにおける肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発：マウス肝癌細胞を皮下に移植し、一定の増殖が得られた後、これをラジオ波凝固療法にて治療できる動物モデルを用いて、同治療を行うと、反対側に移植した未治療の肝癌が縮小するという知見が得られた。各種免疫学的解析により、同治療法が抗腫瘍免疫を誘導していることを明らかにした。また動物モデルにおいて樹状細胞、腫瘍抗原由来ペプチド、各種ケモカインの投与により、肝癌治療において誘導された抗腫瘍免疫をさらに増強・維持させることのできる手法を開発した。

4)肝癌患者における肝癌治療後の抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす癌免疫療法の開発：上記動物モデルにおける知見を踏まえ、同様の解析をラジオ波焼灼療法施行肝癌患者で行ったところ、ヒトにおいても同治療によって肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫が誘導できることを明らかにした。同治療を行った際に誘導できる抗腫瘍免疫反応の頻度は他の肝癌治療のもの比べて、高率であった。また同時に、同治療によって抗腫瘍免疫を誘導した際に肝癌患者リンパ球が認識する腫瘍抗原やその T 細胞エピトープを同定した。さらに、本治療方法において患者末梢血から誘導した樹状細胞や抗原ペプチドを同時に投与

することにより、こうした抗腫瘍効果をさらに増強できる手技を確立した。

これらの結果は今後の肝癌免疫療法の開発に有用な情報となると考えられる。現在、上記 1)~4)の検討によって得られた手法と抗原エピトープを含む人工ペプチドを用いて、肝癌患者の免疫療法の臨床試験を準備している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① 酒井佳夫, 水腰英四郎 (他 6 名, 5 番目)

Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients.

Cancer Research, 68, 10267-10279, 2008, 査読有

② 水腰英四郎, 本多政夫 (他 4 名, 1 番目)

Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.

Journal of Hepatology, 49, 946-954, 2008, 査読有

③ 水腰英四郎, Eisenbach C (他 10 名, 1 番目)

Hepatitis C virus (HCV)-specific immune responses of long-term injection drug users frequently exposed to HCV.

Journal of Infectious Disease, 198, 203-212, 2008, 査読有

④ 水腰英四郎, 中本安成 (他 1 名, 1 番目)

樹状細胞選択的血管内投与による肝臓癌の免疫療法, G. I. Research, 16 巻, 32-39, 2008,

査読無

⑤ 喜多裕樹, 水腰英四郎 (他 7 名, 2 番目)  
Impact of diabetes mellitus on prognosis  
of patients infected with hepatitis C  
virus.

Metabolism, 56, 1682-1688, 2007, (査読有)

⑥ 小村卓也, 水腰英四郎 (他 11 名 2 番目)  
American Journal of Gastroenterology, 102,  
1939-1946, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①水腰英四郎, Cellular immune responses  
to multidrug resistance-associated  
protein 3 in the patients with  
hepatocellular carcinoma., The 51th  
annual meeting of the American  
association for the study of liver  
disease, 2008.11.3, サンフランシスコ

②水腰英四郎, 肝細胞癌患者における MRP3  
に対する免疫反応の解析, 第 44 回日本肝臓  
病学会総会, 2008.6.5, 愛媛

③水腰英四郎, 肝癌再発抑制を目的とした樹  
状細胞による免疫療法の開発, 第 94 回日本  
消化器病学会総会, 2008.5.9, 福岡

④水腰英四郎, Enhancement of  
Tumor-specific T Cell Responses by  
Transcatheter Arterial Embolization with  
Dendritic Cells for Hepatocellular  
Carcinoma, Keystone symposia, 2008.4.1,  
ソルトレイク

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水腰 英四郎 (MIZUKOSHI EISHIRO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 90345611